

高亲和力巯基偶联树脂

1、产品描述

金斯瑞高亲和力巯基偶联树脂 (L00403) 是由碘乙酸衍生物共价结合到 4% 交联的琼脂糖构成。它能够简单、快速地结合含巯基的多肽、蛋白或者其他生物配体，和配体的自由巯基形成稳定的硫醚键，从而固定配体进行后续的亲和吸附。每毫升的填料树脂可以结合超过 1 mg 的含有巯基的 7 氨基酸多肽。高亲和力巯基偶联树脂的主要特性见表一。

金斯瑞高亲和力巯基偶联试剂盒 (L00404) 包含高亲和力巯基偶联树脂和纯化抗体必要的试剂。

表一：

柱体积	5 ml (10 ml 总体积含 50% 保护液)
配体	碘乙酸衍生物
基质	4% 交联的琼脂糖微球
pH 稳定性	pH 5-10
吸附量	每毫升填料吸附量 > 3 mg 羊 IgG
平均粒径	90 μm (45-165 μm)
存储条件	2-8°C
保质期	2-8°C 储存 18 个月

2、相关产品

作为高亲和力巯基偶联树脂的衍生产品，金斯瑞还提供了一种可以使目的抗体纯化更加便捷的试剂盒——高亲和力巯基偶联试剂盒 (产品编号 L00404)。两种产品的规格和组成见表二。

表二：

成份	L00403	L00404
高亲和力巯基偶联树脂	10 ml (20 ml 含 50% 保护液)	5 ml (10 ml 含 50% 保护液)
亲和层析柱		3 个
5×偶联缓冲液		30 ml
L-半胱氨酸盐酸盐		10 ml (加入 10 ml 偶联缓冲液溶解固体)
储存缓冲液		20 ml
5×结合/洗杂缓冲液		70 ml
洗脱缓冲液		70 ml
中和缓冲液		15 ml

注意：所有缓冲液在使用前都应混合均匀。

3、使用前准备

试剂准备

所用缓冲液需采用超纯水配制，使用前建议用 0.45 μm 滤膜过滤。

偶联缓冲液：50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA -Na, pH=8.5。

封闭缓冲液：50 mM L-半胱氨酸盐酸盐用偶联缓冲液溶解

储存缓冲液：1×PBS, pH=8.0 (含 20% 乙醇)

结合/洗杂缓冲液：磷酸盐缓冲液（PBS，pH=8.0）。

洗脱缓冲液：0.1 M 甘氨酸 pH =2-2.5

中和缓冲液：1 M Tris-HCl pH =8.5

4、纯化步骤

A. 偶联合巯基的样品到巯基偶联树脂

- 1) **样品制备**。用偶联缓冲液溶解含巯基的蛋白或多肽，使其终浓度大约为 1 mg/ml。
- 2) **平衡**。将空层析柱固定在铁架台上，加入巯基偶联树脂，让其缓慢地沉降到管底。加入 3 倍柱体积的偶联缓冲液，让缓冲液缓慢地流出，流速大约为 1 ml/min。重复上述操作 2 次。
- 3) **偶联**。盖上底部的盖子，加入含有巯基的多肽或者蛋白样品，1 ml 填料树脂加入大约 1 ml 的样品。盖上层析柱的上盖放置在摇床上，室温孵育 30 分钟。
- 4) **洗杂**。将层析柱固定在铁架台上，取下底部的盖子，让溶液流出，填料沉降到底部。加入 3 倍柱体积的偶联缓冲液洗涤，流速大约为 1 ml/min。收集流出液，测其 A280 值，并与偶联前相比较，判断偶联效率。
- 5) **封闭**。加入 10 ml 偶联缓冲液充分溶解 L-半胱氨酸盐酸盐制备封闭缓冲液。盖住底部的盖子，加入与柱体积相同的封闭缓冲液。盖上层析柱的上盖放置在摇床上，室温孵育 30 分钟。封闭好后，将层析柱固定在铁架台上，取下下部的盖子，让溶液流出，填料沉降到底部。
- 6) **储存**。如果立即使用，直接进入 B 步骤。如果以后再使用，先用 3 倍柱体积的结合/洗杂缓冲液洗涤，再加入 1 倍柱体积的存储缓冲液 2-8℃ 储存。
注意：需避光保存，严禁冻结。

B. 过柱纯化抗体

- 1) **平衡**。加入 5 倍柱体积的结合缓冲液，让溶液流出，填料沉降到底部。
- 2) **抗体结合**。加入样品，让样品缓慢流出，流速大约为 0.5 ml/min。收集流出液，可使用 SDS-PAGE 检测纯化效率。如有必要，可以重复或循环上样。
- 3) **洗杂**。使用大约 50 倍柱体积的洗杂缓冲液洗涤，流速大约为 1.5 ml/min，或者使用紫外检测仪直到 A280 值稳定为止。
- 4) **洗脱**。洗杂完毕后，加入 5-10 倍柱体积的洗脱缓冲液，流速大约 1 ml/min，使用紫外检测仪测定 A280 值直到稳定为止。收集洗脱液，加入中和缓冲液（约 1/10 洗脱液体积）调节 pH。
- 5) **再生**。用 5 倍柱体积的平衡缓冲液洗涤，去除剩下的洗脱缓冲液，加入 1 倍柱体积的存储缓冲液 2-8℃ 储存。**严禁冻结**。

C. 储存

需避光保存在含有 20%乙醇的结合/洗杂缓冲液中，2-8℃ 保存。**严禁冻结**。所有缓冲液放置在 2-8℃，其他材料放置于常温。

5、故障排除

问题	可能原因	解决方案
层析柱流速过低 (<0.5 ml/min)	缓冲液或样品中微小的空气泡沫或颗粒堵塞了填料的孔径	去除缓冲液和样品中的气泡，重新悬浮填料，避免层析柱过于干燥
加入偶联缓冲液后，蛋白或多肽样	蛋白或多肽样品在偶联缓冲液中	将样品溶于 30% DMSO、DMF 或 6

品中有沉淀	不溶解	M 盐酸胍的缓冲液中
偶联效率很低	巯基被氧化	在偶联前加入适量的还原剂，如 DTT 或 TCEP，脱盐处理后，再进行偶联
洗脱缓冲液中的抗体纯度低	洗涤不充分	增加结合缓冲液或洗涤缓冲液的体积

6、订购信息

高亲和力巯基偶联树脂 产品编号: L00403
高亲和力巯基偶联试剂盒 产品编号: L00404

南京金斯瑞生物科技有限公司
江苏省南京市江宁科学园雍熙路28号，邮编211100
客服热线: 025-58897288-5810
订购邮箱: product@genscript.com.cn
公司主页: <http://www.genscript.com.cn>